

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2014 sampai dengan Maret 2014, di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, mikropipet, *mikrotube*, mikrotip, rak tabung reaksi, jarum ose, gelas ukur, erlenmeyer, *beaker glass*, *autoclave*, *laminair air flow*, lemari es, kompor listrik, pinset, pembakar spritus, kertas kopi, tisu, kapas, aluminium foil, inkubator bakteri, *anaerobic jar*, *vortex mixer*, *sentrifuged* dan alat-alat pendukung lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Nutrient Agar* (NA), *MRS Broth*, *Bacterial Agar*, akuades, 13 isolat bakteri dari usus itik (koleksi Sutrisna, 2010) yang diremajakan, isolat bakteri uji *Salmonella* sp umur 24 jam, alkohol 70%, spiritus, lilin, antibiotik basitrasin, spiramisin, lincomisin, clindamisin dan streptomisin.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini bersifat deskriptif yang terdiri dari 2 tahap. Tahap pertama yaitu uji daya hambat BAL terhadap *Salmonella* sp menggunakan metode agar sumur oleh Carson dan Relay (Rahmawati, 2012). Parameter yang diamati adalah diameter zona bening yang terbentuk disekitar sumur. Data besar zona hambat (ditandai dengan zona bening) dianalisis secara deskriptif dengan histogram. Tahap kedua yaitu uji daya tahan BAL terhadap antibiotik menggunakan metode agar sumur oleh Carson dan Relay. Antibiotik yang digunakan yaitu basitrasin, spiramisin, lincomisin, clindamisin dan streptomisin. Parameter yang diamati adalah koloni BAL yang tumbuh meskipun diberi antibiotik.

D. Prosedur Kerja

1. Peremajaan

Setiap isolat bakteri usus itik koleksi Sutrisna (2010) pada media cair MRS *Broth* diambil 1 ml dan dibiakkan pada tabung reaksi yang berisi 9 ml media MRS *Broth* steril, kemudian diinkubasi dalam *anaerobic jar* selama 48 jam.

2. Pembuatan starter

Bakteri yang telah diremajakan diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml MRS *Broth* steril, lalu diinkubasi selama 48 jam dalam *anaerobic jar*.

3. Penyiapan zat antibakteri

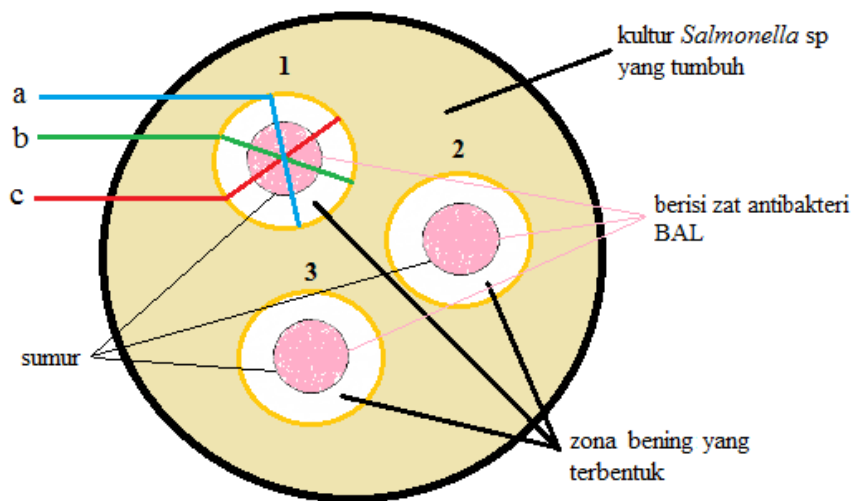
Sebanyak 2 ml starter diambil dan dimasukkan ke dalam 8 ml MRS *Broth* steril, kemudian diinkubasi selama 48 jam. Setelah masa inkubasi, 1 ml kultur dimasukkan ke dalam *microtube* dan di *sentrifuge* dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak antibakteri yang diuji daya antibakterinya terhadap *Salmonella* sp.

4. Uji daya antibakteri terhadap *Salmonella* sp.

Sebanyak 1 ml suspensi *Salmonella* sp. diinokulasi secara *pour plate* ke dalam cawan petri steril dan ditambahkan 20 ml media NA steril. Setelah media padat dibuat sumuran dengan diameter lubang 0,7 cm. Setiap cawan petri berisi tiga sumuran. Pada masing-masing sumuran, dimasukkan zat antibakteri sebanyak 0,1 ml, kemudian diinkubasi dalam inkubator suhu 40°C selama 24 jam. Kemampuan daya hambat antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar sumur. Semakin besar diameter zona bening yang terbentuk, maka semakin tinggi daya hambat bakteri asam laktat terhadap *Salmonella* sp.

5. Penentuan diameter zona hambat antibakteri

Diameter zona bening yang terbentuk pada setiap sumuran diukur dari tiga sisi yang berbeda, kemudian di rata-rata (Gambar 8).



Gambar 8. Cara Mengukur Diameter Zona Bening Antibakteri
Keterangan:

a = diameter zona bening ulangan 1

b = diameter zona bening ulangan 2

c = diameter zona bening ulangan 3

1, 2 dan 3 = sumur dengan 3 kali ulangan

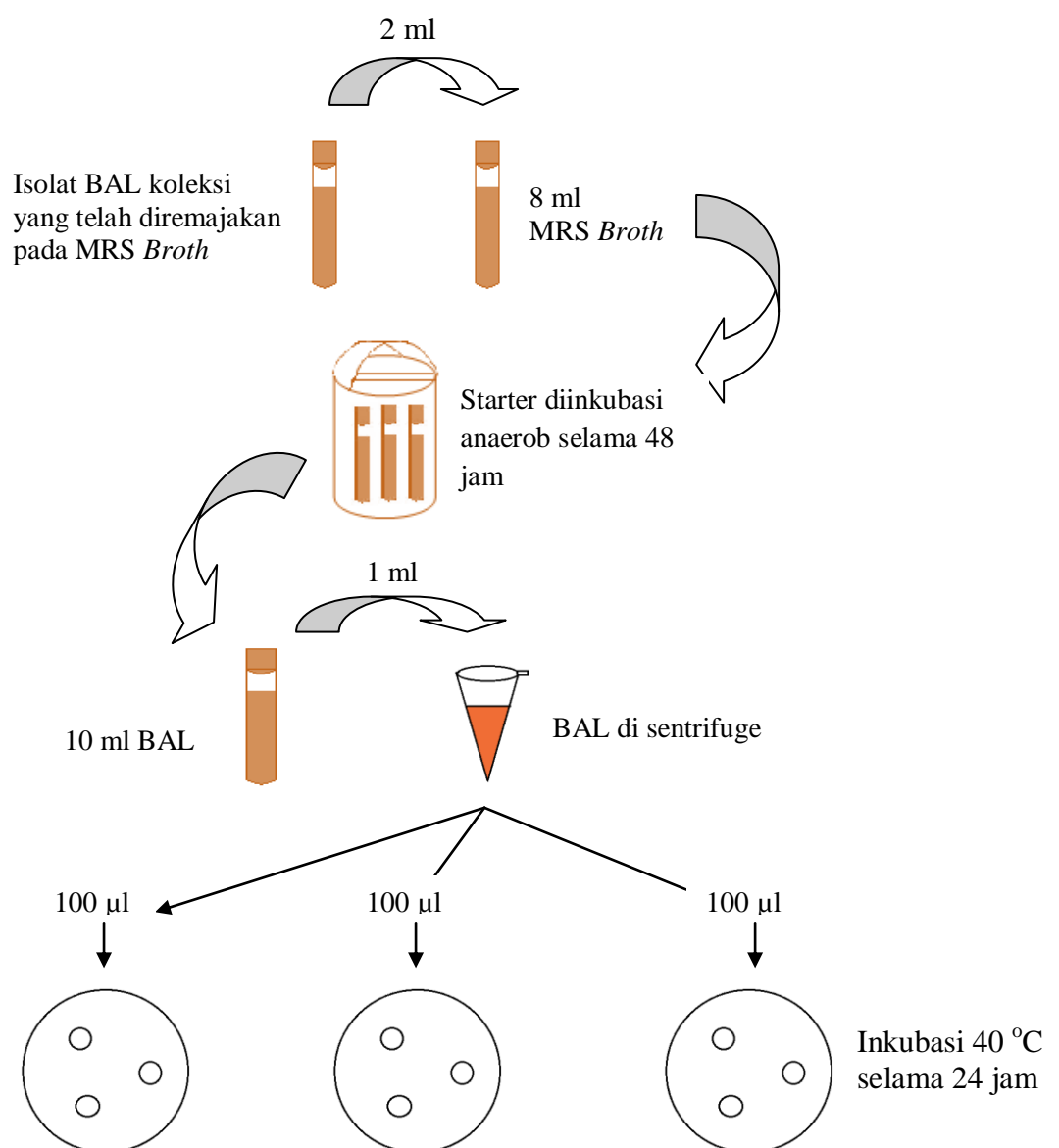
6. Uji ketahanan bakteri asam laktat terhadap antibiotik

Bakteri asam laktat yang menghasilkan zona hambat terbesar, diuji ketahanannya terhadap antibiotik basitrasin, spiramisin, lincomisin, tetrasiklin dan streptomisin. Masing-masing antibiotik dibuat suspensi dengan konsentrasi 1%. Metode yang digunakan yaitu metode agar sumur oleh Carson dan Relay. Suspensi BAL diinokulasi ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml akuades steril sampai diperoleh kekeruhan yang sama dengan Standar Mac Farlan ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Kemudian sebanyak 1 ml BAL dimasukkan ke dalam cawan petri steril dan ditambahkan media MRS Agar. Setelah media padat dibuat sumuran berdiameter 0,7 cm dengan pengulangan tiga kali sumuran pada setiap cawan petri. Pada masing-masing sumuran,

dimasukkan antibiotik sebanyak 0,1 ml. Kultur tersebut kemudian diinkubasi pada *anaerobic jar* selama 24 jam. Parameter yang diamati yaitu ketahanan BAL dengan adanya pertumbuhan koloni di sekitar sumuran antibiotik.

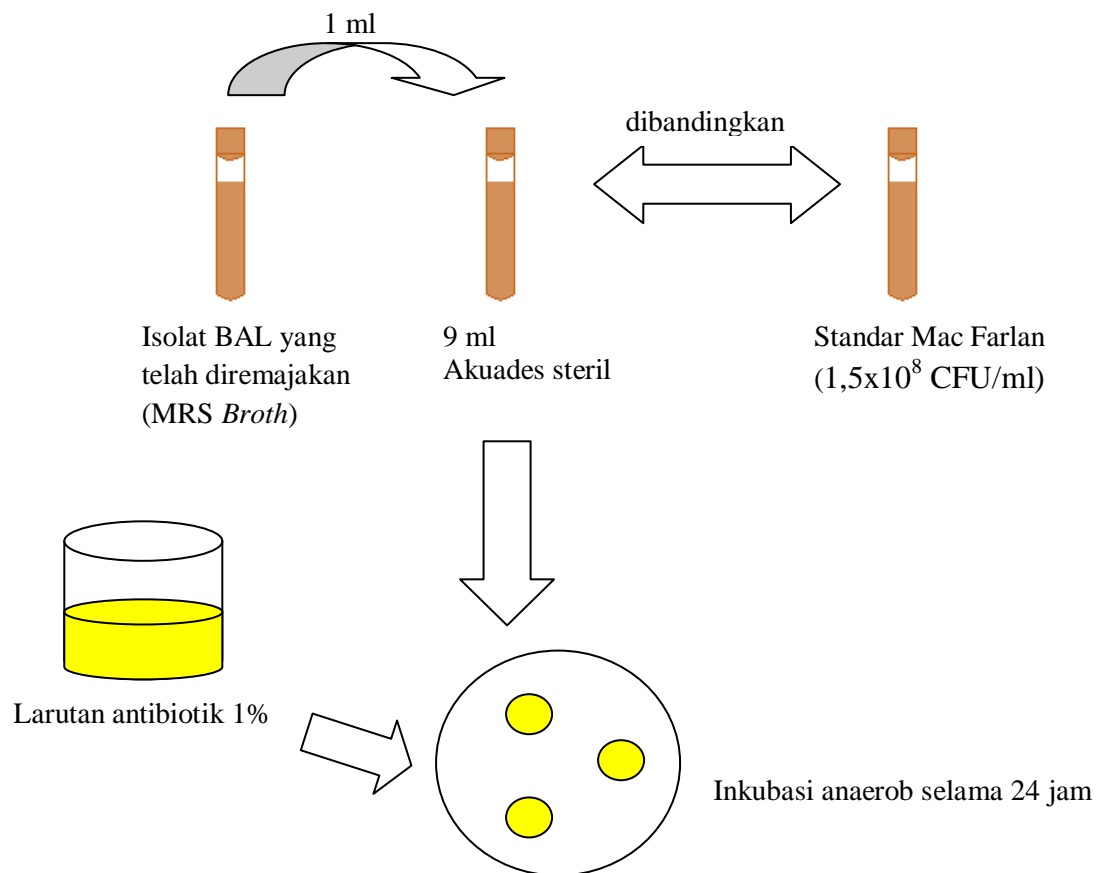
E. Diagram Alir

1. Diagram alir uji daya hambat BAL terhadap *Salmonella* sp.



Gambar 9. Diagram alir uji daya hambat BAL terhadap *Salmonella* sp.

2. Diagram alir uji ketahanan BAL terhadap antibiotik



Gambar 10. Diagram alir uji ketahanan BAL terhadap antibiotik